

Wykaz skrótów do rozdziału 1

GSH – zredukowany glutation

GSSG – disulfid glutationu

ONOO⁻ – nadtlendioazotyn

RFT – reaktywne formy tlenu

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

1. UDZIAŁ TIOLI W MECHANIZMACH ANTYOKSYDACYJNYCH I PROOKSYDACYJNYCH KOMÓREK

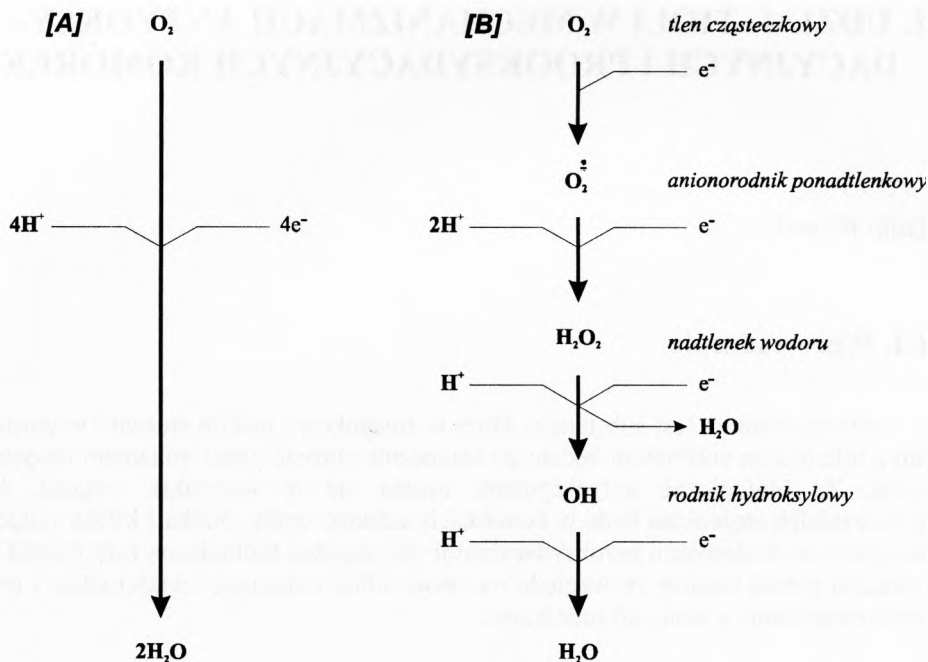
Lidia Włodek

1.1. Wprowadzenie

Antyoksydantem jest substancja, która w stosunkowo niskim stężeniu w porównaniu z utlenianym substratem będzie go skutecznie chronić przed zmianami oksydacyjnymi. Za biologiczne antyoksydanty uważa się te wszystkie związki, które w niewielkich stężeniach będą w komórkach osłaniać lipidy, białka i kwasy nukleinowe przed uszkodzeniami peroksydacyjnymi. Szczególną biologiczną rolę pośród tych połączeń pełnią biotiole ze względu na swoje silnie redukujące właściwości i możliwość reagowania z wolnymi rodnikami.

1.2. Powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT)

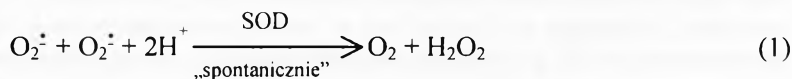
Przyczyną uszkodzeń tkanek i narządów prowadzących do różnych stanów patologicznych są pojawiające się wolne rodniki, będące atomami lub grupami atomów posiadającymi niesparowany elektron [prace przeglądowe: 1, 2, 3, 4]. W warunkach fizjologicznych głównym źródłem wolnych rodników są procesy oddechowe w mitochondriach, gdzie następuje redukcja cząsteczki tlenu (O_2) do wody w wyniku przyłączenia czterech elektronów (ryc. 1) [5, 6]. Tymczasem nawet w czynnościowo sprawnych mitochondriach przepływ elektronów jest „nieszczelny” i pewna ich ilość „wycieka”, redukując po drodze tlen w reakcji jednoelektronowej do anionorodnika nadadtlenowego $O_2^{\cdot -}$, a w reakcji dwuelektronowej z utworzeniem nadtlenu wodoru H_2O_2 (ryc. 1). Natomiast trójelektronowa redukcja cząsteczki tlenu – która jednak nie zachodzi bezpośrednio – jest źródłem rodnika hydroksylowego $\cdot OH$, jednego z najbardziej reaktywnych i toksycznych wolnych rodników, jaki występuje w układach biologicznych.



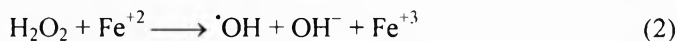
Ryc. 1. Redukcja tlenu cząsteczkowego do wody [A] i powstawanie reaktywnych form tlenu [B]

Do reaktywnych form tlenu (RFT), czyli produktów jego niepełnej redukcji, zaliczamy: rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) i anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$) oraz rodnik wodoronadtlenkowy HO_2^{\cdot} (postać po przyłączeniu protonu), a także niebędące rodnikami H_2O_2 i tlen singletowy 1O_2 .

W większości biologicznych reakcji pierwotnie powstaje $O_2^{\cdot -}$, który z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) ulega przekształceniu do H_2O_2 (reakcja 1):



Nadtlenek wodoru nie wykazuje bezpośrednio silnego działania utleniającego, jednak jego możliwość łatwego przenikania przez błony komórkowe i utleniania jonów metali przejściowych (Fe^{+2} , Cu^{+1}) powoduje, że w różnych miejscach cytoplazmy może z jego udziałem dochodzić do powstawania reaktywnego rodnika hydroksylowego $\cdot OH$ (reakcja 2):



Ponowna redukcja Fe^{+3} i regeneracja Fe^{+2} może przebiegać z udziałem anionorodnika ponadtlenkowego (reakcja 3):



Sumując równania 2 i 3, otrzymujemy reakcję 4, zwaną „biologiczną reakcją Fentona” [7]:



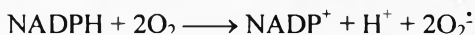
W obecności jonów metali przejściowych pojawienie się jednej postaci reaktywnych form tlenu stwarza możliwość pojawienia się w komórce pozostałych.

H_2O_2 może powstawać również jako produkt działania różnych oksydaz, jak np. oksydaza D-aminokwasów i inne.

Z biologicznego punktu widzenia niebezpieczeństwem związanym z obecnością H_2O_2 jest także możliwość utleniania grup tiolowych białek i związków niskocząsteczkowych. Z powyższych powodów H_2O_2 jest uważany za związek wysoce toksyczny, a wszechobecna aktywność katalazy i peroksydazy glutationowej czuwa w komórkach nad utrzymaniem jego bardzo niskiego poziomu (10^{-9}M – 10^{-7}M).

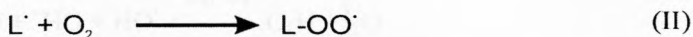
W warunkach fizjologicznych jednoelektronowemu utlenianiu z powstaniem $\text{O}_2^{\cdot -}$ ulegają także zredukowane formy wielu metabolitów, takich jak: nukleotydy flawinowe, katecholaminy (DOPA i adrenalina), związki tiolowe, tetrahydropterydy, cukry redukujące, a także różne leki [7]. Wolnorodnikowe formy leków mogą także z dużym niebezpieczeństwem dla komórek wiązać się kowalencyjnie z białkami i DNA. Wzmoczone generowanie RFT może również wynikać z oddziaływania na komórki promieniowania jonizującego, UV czy ultradźwięków ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{H} + \cdot\text{OH}$).

Szczególną rolę w wytwarzaniu RFT pełnią limfocyty, monocyty i makrofagi. Obecność w organizmie ognisk zapalnych wywołanych wirusami lub bakteriami stymuluje gwałtowny, kilkudziesięciokrotny wzrost zużycia tlenu przez komórki fagocytyczne, zwany „wybuchem tlenowym”. Jest to stan wzmożonej produkcji $\text{O}_2^{\cdot -}$ w reakcji katalizowanej przez oksydazę NADPH błon granulocytów [8, 9]:

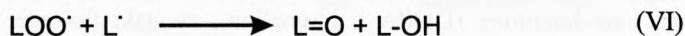
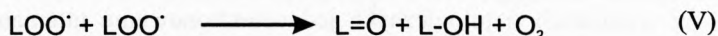


1.3. Peroksydacyjne uszkodzenia w komórkach

Charakterystyczną cechą wolnych rodników jest ich niezwykła reaktywność spowodowana dążeniem do stabilności poprzez sparowanie elektronu. Dlatego w pewnych warunkach pod wpływem wolnych rodników może w komórce nastąpić odebranie elektronu(ów) takim biocząsteczkom, jak: białka, kwasy nukleinowe i lipidy. Szczególnie te ostatnie, będące składnikami błon komórkowych, są podatne na atak wolnych rodników, a odebranie im elektronu zapoczątkowuje wolnorodnikowy proces łańcuchowy, w którym następuje utlenianie kwasów tłuszczowych z utworzeniem nadtlenczków (z ang. *peroxide*); stąd określa się go mianem peroksydacji lipidów [10, 11]. Inicjacją tego procesu jest oderwanie atomu H, pod wpływem rodnika $\cdot\text{OH}$, z powstaniem rodnika alkilowego L^{\cdot} (reakcja I). Powstające następnie w reakcji z tlenem rodniki nadtlenczkowe lipidów L-OO^{\cdot} (reakcja II) mogą odrywać atomy H od kolejnych cząsteczek, z powstaniem wodoronadtlenków lipidów (LOOH) (reakcja III). Rodniki nadtlenczkowe lipidów (L-OO^{\cdot}) mogą również reagować z białkami błony i cytoplazmy:

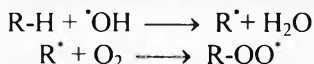


Cykliczne, wielokrotne powtarzanie się reakcji II i III to etap prolongacji, któremu kres mogą położyć reakcje pomiędzy dwoma wolnymi rodnikami z utworzeniem produktów, niebędących już rodnikami, w procesie zwanym terminacją (reakcja IV, V i VI):



Następstwem wzmożonej peroksydacji lipidów błon komórkowych jest wprowadzenie polarnych grup nadtlenkowych, karbonylowych i hydroksylowych, co znacznie obniża ich hydrofobowość oraz prowadzi do powstawania toksycznych aldehydów i węglowodorów. Peroksydacja lipidów następuje w toku normalnego metabolizmu, a nadmierna ekspozycja na RFT jedynie wzmacnia, lecz nie inicjuje tego procesu. Synteza prostaglandyn, tromboksanów i leukotrienów z kwasu arachidonowego inicjowana jest także przez reakcję peroksydacji.

Nie tylko lipidy, ale również białka [12, 13, 14, 15] i kwasy nukleinowe [16] ulegają peroksydacji, która w tym przypadku nie ma jednak charakteru procesu kaskadowego. Cząsteczki białek nie tak łatwo przekazują sobie wzajemnie niesparowany elektron, lecz raczej wchodzi w reakcję z askorbinianem lub glutationem, czym przyczyniają się do obniżenia komórkowej puli niskocząsteczkowych buforów redoks.



Następstwem peroksydacji białek jest modyfikacja reszt aminokwasów oraz pęknięcia łańcucha polipeptydowego prowadzące do fragmentacji i agregacji. W przypadkach kiedy niesparowany elektron jest zlokalizowany na resztach cysteiny czy tyrozyny, może nastąpić rekombinacja wolnych rodników białkowych prowadząca do powstawania kowalencyjnych dimerów białek. Możliwa jest także modyfikacja grup prostetycznych białek.

Kwasy nukleinowe są znacznie mniej wrażliwe na peroksydację od lipidów i białek. Jedynie pod wpływem $\cdot\text{OH}$, rodnika atakującego praktycznie wszystkie cząsteczki, może nastąpić uszkodzenie zasad, deoksyrybozy, rybozy lub pęknięcie łańcucha poprzez rozerwanie wiązań fosfodiesterowych [16].

RFT w komórkach są więc naturalnymi produktami aerobowego metabolizmu i w fizjologicznych stężeniach pełnią tak ważne funkcje regulacyjne, jak przekazywanie sygnałów wewnątrz- i międzykomórkowych [1, 17, 18]. Są także czynnikami

obronnymi organizmu, biorącymi udział w zabijaniu drobnoustrojów w procesie fagocytozy [19].

Niezależnie od swych ważnych funkcji biologicznych RFT są także czynnikami uszkadzającymi tkanki i mogą stanowić przyczynę takich schorzeń, jak stany zapalne, nowotwory, miażdżyca, zawał mięśnia sercowego, schorzenia immunologiczne, neurologiczne oraz procesy starzenia. Leki stosowane w terapii, takie jak N-acetylocysteina, mogą być antyoksydantami. Inne, takie jak cytostatyki mogą generować RFT, co stanowi istotną komplikację terapii przeciwnowotworowej [20, 21, 22].

RFT podczas tlenowego metabolizmu są zarówno nieustannie generowane, jak i momentalnie unieszkodliwiane poprzez złożony system obrony antyoksydacyjnej (tzw. zmiatacze RFT). Fizjologiczny poziom RFT pozostaje zatem pod bardzo staranną kontrolą. Niebezpieczeństwo pojawia się dopiero wtedy, kiedy nastąpi zakłócenie równowagi pomiędzy pro- i antyoksydantami, czyli zostaną przekroczone możliwości detoksykacyjne komórek. Usuwanie niepożądanych skutków działalności RFT opiera się na dwóch niezależnych mechanizmach. Pierwszy z nich (najważniejszy) używa enzymów, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), chroniąca przed reakcją Fentona, katalaza i peroksydaza glutationowa. Drugi mechanizm ma charakter nieenzymatyczny i polega na działaniu obecnych w komórkach substancji redukujących (antyoksydacyjnych), takich jak: kwas askorbinowy, α -tokoferol, β -karoten, kwas moczowy, a także związki tiolowe: glutation i kwas liponowy.

1.4. Tiole jako biologiczne systemy antyoksydacyjne

Wewnątrzkomórkowy, jak i zewnątrzkomórkowy stan redoksyw tylii odgrywa krytyczną rolę dla struktury i funkcji białek, w regulacji aktywności enzymów, w kontroli aktywności czynników transkrypcyjnych i w obronie antyoksydacyjnej [22, 23]. Antyoksydacyjne właściwości związków tiolowych ujawniają się poprzez różnorodne mechanizmy. Związki te stanowią komponentę tiolowo-disulfidowego buforu redoksyw, są zmiataczami wolnych rodników, jak również chelatorami jonów metali. Tiole hamują utlenianie lipoprotein niskiej gęstości (LDL) osocza ludzkiego [24]. Związki tiolowe, takie jak glutation (GSH), mogą być substratami w specyficznych reakcjach redoks oraz brać udział w redukcji mostków disulfidowych białek, a biosynteza GSH w komórkach spada z wiekiem [25]. Tiole białkowe ulegają reakcjom S-tiolacji zarówno w reakcji z GSSG (białko-S-S-G), jak i z cysteiną (białko-S-S-cys), co prowadzi do powstawania mieszanych disiarczków [26]. Sam GSH nie może być podawany jako lek, ponieważ nie ulega transportowi poprzez błony komórkowe [30]. Natomiast egzogenne prekursor cysteiny, takie jak N-acetylocysteina (NAC), kwas 2-okso-1,2,3,4-tiazolidyno-4-karboksylowy (OTC) i pochodne tiazolidynowe [29] podnoszą poziom GSH w hodowlach komórek oraz w tkankach ludzi i zwierząt [27, 28]. Tak wywołany wzrost poziomu GSH zwiększa tolerancję na stres i może zapobiegać chorobom, dlatego może być stosowany w celach terapeutycznych [30]. Modulowanie poziomu tylii w komórkach, prowadzące do przekroczenia fizjologicznych stężeń, może powodować efekty toksyczne związane z powstawaniem rodnika tyliowego. Dochodzi wtedy do nadmiernego powstawania disulfidów i do niebezpiecznego wzrostu stosunku tylii do disulfidów w osoczu i w komórkach. Wszelkie zmiany w gradientie

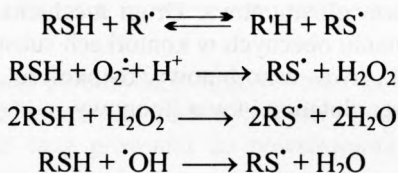
cie redokсовym tioli mogą również wpływać na transport i przekazywanie sygnałów przez błony komórkowe. Do najważniejszych związków tiolowych komórek należą: glutation, cysteina, homocysteina, kwas liponowy, koenzym A, ergotioneina i fosfopantoteina oraz białka, np. albuminy.

1.4.1. Powstawanie rodników tiolowych

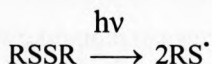
Biotiole są niezwykle skutecznymi antyoksydantami chroniącymi komórki przed następstwami wolnorodnikowych uszkodzeń dzięki reakcjom z wolnymi rodnikami. W reakcjach antyoksydacyjnych tiole ulegają jednoelektronowemu utlenieniu z utworzeniem rodników tiolowych [31]:



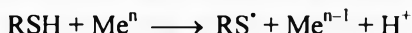
We wszystkich reakcjach tioli z wolnymi rodnikami oraz z nadtlenkiem wodoru powstają rodniki tiolowe:



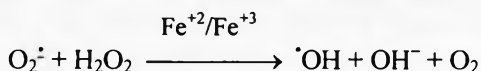
Rodniki tiolowe (RS^{\bullet}) powstają również w reakcji fotolizy disulfidów:



Mogą także powstawać w reakcjach tioli z jonami metali przejściowych, charakteryzujących się również posiadaniem na powłokach wewnętrznych niesparowanych elektronów:



Jony metali przejściowych zmieniające stopień utlenienia stają się bardzo często promotorami reakcji wolnorodnikowych, tak jak w biologicznej reakcji Fentona [32].



W reakcjach tych mogą brać udział nie tylko jony żelaza, ale również jony innych metali przejściowych, obecne w komórkach lub pochodzące z zanieczyszczeń środowiska.

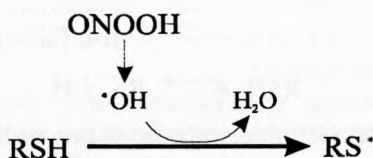
Niektóre biotiole, jak np. cysteina uchodząca za bardzo toksyczny aminokwas, poprzez reakcję redukcji jonów metali (w układach biologicznych głównie jonów żelaza i miedzi) może wywoływać peroksydację lipidów [32, 33]. Związki tiolowe, poprzez redukcję Fe^{+3} do Fe^{+2} , mogą wykazywać aktywność prooksydacyjną, prowadzącą zarówno do powstawania rodnika tiolowego (RS^{\bullet}), jak i do nadmiernego generowania anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$).



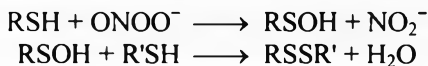
Oznacza to, że tiole przy śladowych ilościach jonów metali przejściowych w obecności tlenu ulegają utlenieniu z powstaniem rodników tiolowych ($-\text{S}^{\cdot}$) i $\text{O}_2^{\cdot-}$, a w konsekwencji również innych reaktywnych form tlenu. W przypadku poszczególnych związków tiolowych niebezpieczeństwo to będzie tym większe, im niższa będzie wartość pK grupy hydrosulfidowej ($-\text{SH}$), ponieważ jon tiolety redukuje jony metali o wiele szybciej niż niedysocjowana grupa $-\text{SH}$.

Do powstawania rodników tiolowych dochodzi również w reakcjach związków tiolowych z silnie utleniającym nadtlenoazotynem (ONOO^-) [34].

W wyniku homolitycznego rozpadu kwasu nadtlenoazotowego (HONOO) dochodzi do uwalniania się rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) zdolnego do utleniania związków tiolowych z utworzeniem rodników tiolowych [34]. Właśnie tę reakcję uważa się za główną przyczynę peroksydacyjnych uszkodzeń wywoływanych przez ONOO^- w komórkach [34]:

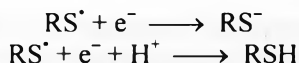


Związki tiolowe mogą być alternatywnie utleniane dwuelektronowo z utworzeniem nietrwałych kwasów sulfenowych, których natychmiastowa reakcja ze związkami tiolowymi prowadzi do powstawania disulfidów [35]:

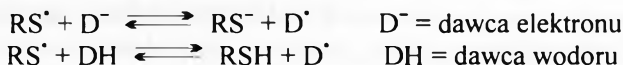


1.4.2. Mechanizm reakcji rodników tiolowych

Główne zainteresowanie, jakie skupiają na sobie związki tiolowe, dotyczy prawie wyłącznie ich antyoksydacyjnych właściwości. Znacznie mniej uwagi poświęca się powstającemu równocześnie rodnikowi tiolowemu (RS^{\cdot}). Tymczasem skuteczność osłaniającej i naprawczej roli tioli zależy nie tylko od możliwości detoksykacji wolnych rodników, ale także od charakteru chemicznego i reaktywności powstającego rodnika tiolowego (RS^{\cdot}) [36]. O antyoksydacyjnym działaniu związków tiolowych decyduje zarówno możliwość sprawnej detoksykacji wolnych rodników, jak i skuteczna inaktywacja powstającego równocześnie rodnika tiolowego. Ponadto szybkie i skuteczne usuwanie rodnika RS^{\cdot} prowadzi do zakłócenia stanu równowagi reakcji antyoksydacyjnej, co zwiększa moc naprawczą tioli [31]. Dlatego związki tiolowe, podobnie jak każdy związek pretendujący do roli antyoksydantu, powinny ulegać natychmiastowej regenerującej redukcji:

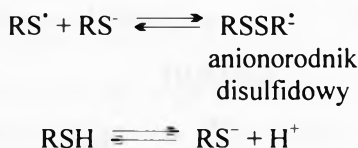


Z wartości standardowych potencjałów redoks obu powyższych reakcji połówkowych jest oczywiste, że w fizjologicznych warunkach rodniki tiylowe są względnie silnymi utleniaczami [37]:



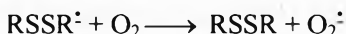
Rodniki tiylowe charakteryzują się zdolnością odbierania atomów wodoru od innych cząsteczek. Z udziałem rodników tiylowych (RS^\bullet) może również następować reakcja transferu elektronu oraz wewnątrzcząsteczkowe przemieszczania się wolnych rodników.

Reakcja rodników tiylowych z anionem tiolanowym prowadzi do powstawania anionorodnika disulfidowego, a o szybkości tej reakcji decyduje wartość stałej dysocjacji grupy $-\text{SH}$ [31, 32, 33, 34, 37]:

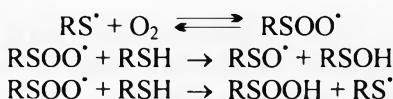


Nasilone powstawanie RSSR^\bullet obserwuje się w przypadku ditioli, takich jak kwas liponowy czy ditiotreitol, jest ono konsekwencją niskich wartości pK_a grup tiolowych, a w konsekwencji większych stężeń w fizjologicznym pH jonu tiolanowego [36].

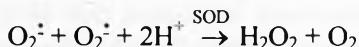
Reakcja anionorodnika disulfidowego z tlenem cząsteczkowym prowadzi do powstania disulfidu (RSSR) oraz anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$), jednej z postaci reaktywnych form tlenu [31, 36]:



Z kolei reakcje addycji rodników tiylowych z tlenem prowadzą do powstawania niebezpiecznych rodników nadtlennokowych, mogących w dalszych reakcjach ze związkami tiolowymi wywoływać generowanie kolejnych wolnych rodników [37]:



Z tego powodu reakcje rodnika tiylowego z anionem tiolanowym (RS^-) są uważane za mniej niebezpieczne od reakcji rodnika tiylowego z tlenem z utworzeniem rodnika nadtlennokowego (RSOO^\bullet). W tym ostatnim przypadku może nastąpić propagowanie łańcuchowych reakcji powstawania wolnych rodników, podczas gdy powstający $\text{O}_2^{\bullet-}$ (w reakcji RSSR^\bullet z O_2) może z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) ulegać inaktywacji:

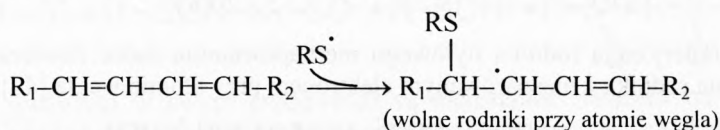


Glutation (GSH) jest tiolowym tripeptydem wszechobecnym w komórkach i występującym w wysokim stężeniu. Z glutationu (GSH) w reakcjach z wolnymi rodnikami powstaje rodnik tiylowy (GS^\bullet), którego dalsze reakcje prowadzą odpowiednio poprzez

GSSG²⁻ ostatecznie do powstania GSSG oraz O₂^{•-}, inaktywowanego z udziałem SOD [27, 38]. Dla sprawnego, antyoksydacyjnego działania GSH – najważniejszego związku tiolowego komórek – konieczna jest zatem jego ścisła kooperacja z SOD [38]. Dlatego Winterbourg [39] zaproponowała hipotezę, że ścisłe współdziałanie GSH i SOD jest warunkiem skutecznego usuwania powstających wolnych rodników w komórkach.

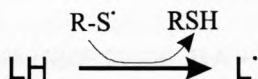
Redukcja nadtlenu wodoru (H₂O₂) i organicznych nadtlenków (R-OOH) przebiega z udziałem peroksydazy glutationowej, zawierającej selenocysteinę w centrum aktywnym. Dzięki temu możliwe jest dwuelektronowe utlenienie GSH z utworzeniem disulfidu glutationu (GSSG) bez konieczności uwalniania rodnika tiolowego glutationu (GS[•]) (p. rozdział 4). Peroksydaza glutationowa ma również możliwość utleniania grup tiolowych w białkach z utworzeniem disulfidów. Pojawia się zatem pytanie: co stanowi główną rolę fizjologiczną tego enzymu, redukcja wodoronadtlenków czy też utlenianie związków tiolowych [40].

Rodniki tiolowe w reakcjach z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi mogą ulegać bezpośredniej addycji do wiązań podwójnych [41]:

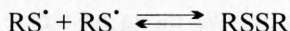


Równocześnie towarzyszy temu izomeryzacja cis/trans, co powoduje wzrost w kwasach tłuszczowych ilości wiązań podwójnych typu trans [42]. Tego typu izomeryzacja jest charakterystyczna tylko dla reakcji nienasyconych kwasów tłuszczowych z rodnikiem tiolowym. Żaden z innych wolnych rodników: alkilowych (R[•]) bądź [•]OH nie wykazuje możliwości indukowania takiej stereochemicznej transformacji. Dlatego efektem reaktywności rodników tiolowych z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi blon jest zmiana struktury lipidów. Następują zmiany w upakowaniu i gęstości dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej i zaburzenia jej biologicznej funkcji [43].

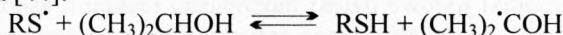
Rodnik tiolowy, poprzez swoją zdolność do parowania elektronu, może również odbierać wodór lipidom, zapoczątkowując w ten sposób proces peroksydacyjnych uszkodzeń lipidów:



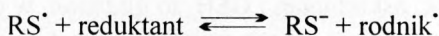
Rodniki tiolowe mogą ulegać dimeryzacji z utworzeniem disulfidów, co powoduje terminację reakcji [36]:



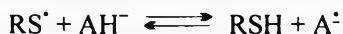
Z udziałem rodników tiolowych może także następować oderwanie atomu wodoru od związków organicznych, na przykład z alkoholu powstaje rodnik przy drugorzędowym atomie węgla [44]:



Rodniki tiolowe mogą również w jednoelektronowych reakcjach utleniać substraty będące donorami elektronów:



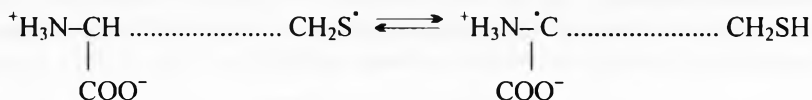
Przykładem przemieszczania się elektronu, w którym biorą udział rodniki tiylowe, może być utlenianie askorbinianu (AH^-) z utworzeniem rodnika askorbylowego [31, 45].



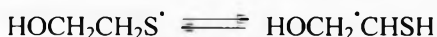
Innym przykładem przemieszczania się jednego elektronu (niedotyczącym rodnika tiylowego, ale z nim ściśle powiązanym) jest poznana wcześniej reakcja anionorodnika disulfidowego RSSR^\bullet z tlenem:



W przypadku rodnika tiylowego glutationu stwierdzono możliwość występowania wewnątrzcząsteczkowego, tautomerycznego przemieszczania się atomu wodoru, czego skutkiem jest powstawanie rodników przy jednym z atomów węgla [46]:



Tautomeryzacja rodnika tiylowego merkaptotetanolu może również prowadzić do powstania rodnika z niesparowanym elektronem przy atomie węgla [47]:



Antyoksydacyjne reakcje tioli prowadzą poprzez rodniki tiylowe RS^\bullet , a następnie poprzez anionorodnik disulfidowy RSSR^\bullet ostatecznie do disulfidów i O_2^\bullet . Powstający w tym procesie O_2^\bullet jest inaktywowany w wyniku reakcji katalizowanej działaniem SOD [48].

W detoksykacji rodników tiylowych niezwykle ważną rolę odgrywa inny antyoksydant komórek – witamina C. W fizjologicznych warunkach reakcja rodnika tiylowego glutationu (RS^\bullet) z askorbinianem może przebiegać o wiele szybciej od reakcji z anionem tiolanowym lub z tlenem. Standardowy potencjał oksydacyjno-redukcyjny jednoelektronowej reakcji redukcji askorbinianu wynosi $E_{0\text{AH}^\bullet/\text{AH}^-} = 0,28 \text{ V}$, podczas gdy $E_{0\text{GS}^\bullet/\text{GSH}^-} = +0,9 \text{ V}$, dlatego w warunkach biologicznych rodniki tiylowe glutationu mogą utleniać askorbinian [31]:



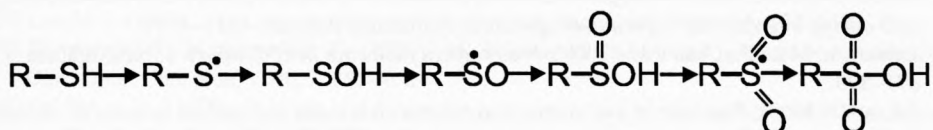
Powstający w tych reakcjach rodnik askorbylowy, w odróżnieniu od rodnika tiylowego glutationu, jest rodnikiem mało reaktywnym, co czyni askorbinian doskonałym antyoksydantem. Rodniki askorbylowe mogą następnie ulegać reakcji dysproporcjonowania:



Oznacza to, że rodniki tiylowe dzięki możliwości reakcji z askorbinianem ulegają skutecznej detoksykacji, co zwiększa moc antyoksydacyjną i naprawczą tioli. Stanowi to równocześnie przykład współdziałania najważniejszych antyoksydantów komórek, tioli i kwasu askorbinowego. Jeżeli zatem porównamy dwa najważniejsze związki antyoksydacyjne komórek, askorbinian i GSH, to glutation, w odróżnieniu od askorbinianu, jest potencjalnym źródłem takich rodników, jak GS^\bullet , GSSG^\bullet , GSOO^\bullet i O_2^\bullet , i dlatego wymaga współdziałania SOD. Pojawia się zatem pytanie: czy to rodnik O_2^\bullet

(rozkładany przez SOD), czy też rodnik askorbylowy, powstający w reakcji z rodnikiem $-S^{\bullet}$, staje się ostatecznym produktem detoksykacji wolnych rodników z udziałem tioli. Wardman [31] uważa, że reakcja rodników tiolowych (GS^{\bullet}) z askorbinianem z powstaniem rodnika askorbylowego jest najbardziej prawdopodobnym mechanizmem związanym z „reperującym” działaniem tioli.

Ważną biologiczną cechą związków tiolowych jest udział w reakcjach utleniania i redukcji, w których siarka grup tiolowych przechodzi na wyższy stopień utlenienia, co obserwujemy w tlenowej biodegradacji cysteiny w komórkach. Do najważniejszych produktów utlenienia siarki grup hydrosulfidowych ($-SH$) kolejno należą: rodniki tiolowe, kwasy sulfenowe, kwasy sulfinylowe, kwasy sulfonowe i odpowiadające im rodniki [48]. Utlenianie związków tiolowych do kwasów sulfinowych i sulfonowych jest procesem nieodwracalnym i zwykle prowadzi do utraty aktywności biologicznej cząsteczek.



Człowiek i zwierzęta w swym środowisku są nieustannie narażeni na kontakt z licznymi egzogennymi związkami tiolowymi oraz z powstającymi z nich disulfidami. Związki tiolowe występują w pożywieniu, pochodzą również z zanieczyszczenia środowiska i ulegają w komórkach biodegradacji do różnego typu związków siarki. Aromatyczne związki tiolowe, pochodne benzenotiolu występują w pieczonym mięsie, a furano-3-tiol w mięsie ryb [49]. Różne wyroby spożywcze i przyprawy są wzbogacane w związki tiolowe lub disulfidowe dla poprawienia smaku i aromatu. Występujące w roślinach związki siarki mogą stać się dla niektórych zwierząt toksyczne poprzez możliwość przekształceń do związków tiolowych. Na przykład, w warzywach pokrewnych cebuli i kabaczkom występują alkilosulfoksydy cysteiny, których biodegradacja prowadzi do metanotiolu [50]. Rośliny te są toksyczne dla owiec i bydła, które popadają w ciężką anemię właśnie ze względu na powstający metanotiol i odpowiedni dimetylodisulfid. Dla psów i kotów z kolei toksycznym, wywołującym hemolizę związkiem jest występujący w cebuli 1-propenotiol [51].

Proces hemolizy, jaki może występować u zwierząt pod wpływem roślinnych związków tiolowych, inicjuje działaniem hemoglobiny jednoelektronowa reakcja utleniania jonu tiolanowego (RS^{-}) z utworzeniem niebezpiecznego rodnika tiolowego (RS^{\bullet}). Następstwem tego może być nadmierne generowanie w erytrocytach H_2O_2 , a w konsekwencji również innych RFT, co prowadzi do zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej, peroksydacji lipidów błon komórkowych i hemolizy [49]:



Nie istnieją doniesienia o toksycznym działaniu tioli pochodzenia roślinnego u ludzi. Hemoliza i anemia pod wpływem egzogennych związków tiolowych, a także różnych innych ksenobiotyków, występuje tylko u osób cierpiących na niedobór aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w erytrocytach, co wiąże się z niedoborem głównego antyoksydantu tych komórek – glutationu (p. rozdział 4).

Podsumowując, redukujące działanie związków tiolowych w stosunku do wolnych rodników wiąże się z reakcjami powstania rodnika tylowego (RS^{\bullet}), którego szybkość i skuteczność usuwania ma istotny wpływ na antyoksydacyjne lub prooksydacyjne działanie tioli w komórkach. Obecnie prowadzone badania nad powstawaniem i reaktywnością rodników tiolowych dotyczą głównie niskocząsteczkowych związków tiolowych. Dlatego w przyszłości wydaje się interesujące i konieczne poszerzenie tych badań również nad wszystkimi aspektami związanymi z powstawaniem rodników tiolowych związków wysokocząsteczkowych, to jest białek (B-S $^{\bullet}$).

Literatura

- [1] Bauer G. (2000), *Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective and interactive signals during intercellular induction of apoptosis*. Anticancer Res., 20, 4115–4119.
- [2] Lewen A., Matz P., Chan P.H. (2000), *Free radical pathways in CNS injury*. J. Neurotrauma, 17, 871–890.
- [3] Jakus V. (2000), *The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease*. Bratisl. Lek. Listy, 101, 541–551.
- [4] Simon H.V., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. (2000), *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 5, 415–418.
- [5] Raha S., Robinson B.H. (2000), *Mitochondria, oxygen, free radicals, disease and aging*. Trends-Biochem. Sci., 25, 502–508.
- [6] Sastre J., Pallardo F.V., Garcia-de-la-Asuncion J., Vina J. (2000), *Mitochondria, oxidative stress and aging*. Free Radic. Res., 32, 189–198.
- [7] Bartosz G. (1995), *Biologiczne znaczenie reakcji RFT*. W: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 78–85.
- [8] Jones R.D., Hancock J.T., Morice A.H. (2000), *NADPH oxidase: a universal oxygen sensor?* Free Rad. Biol. Med., 29, 416–424.
- [9] Karupiah G., Hunt N.H., King N.J., Chandri G. (2000), *NADPH-oxide, Nramp1 and nitric oxide synthase 2 in the host antimicrobial response*. Rev. Immunogenetics, 2, 387–415.
- [10] Ursini F., Maiorino M., Hochstein P., Ernster L. (1989), *Microsomal lipid peroxidation: mechanism of initiation*. Free Radical. Biol. Med., 6, 31–36.
- [11] Ernster L. (1993), *Lipid peroxidation in biological membranes: Implications and mechanisms*. W: *Active Oxygen, Lipid Peroxides and Antioxidant*. Ed. Yagi K, CRC Press, Boca Raton FL, 1–38.
- [12] Shacter E. (2000) *Quantification and significance of protein oxidation in biological samples*. Drug Metab. Rev. 32, 307–326.
- [13] Griffiths H.R. (2000), *Antioxidants and protein oxidation*. Free Radic. Res., 33 suppl. S47–S58.
- [14] Chevion M., Berenshtein E., Statman E.R. (2000), *Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker damage*. Free Radic. Res., 33, suppl. S99–S108.
- [15] Breggere F., Milner Y., Friguet B. (2000), *Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cell*. J. Geront., 55, B220–B227.
- [16] Song S., Sanchez-Ramas J. (2000), *DNA damage repair and antioxidant systems in brain regions: a correlative study*. Free Rad. Biol. Med., 28, 779–785.
- [17] Azevedo L.C., Pedro H.A., Souza L.C., de Souza H.P., Janiszewski M., da-Luz P.L., Lauridno F.R. (2000), *Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis*. Cardiovas. Res., 47, 436–445.

- [18] Fukai M. (2000), *Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathology*. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 2175–2183.
- [19] Krause K.H. (2000), *Professional phagocytes: predators and prey of microorganisms*. *Schweiz. Med. Wochenschrift*, 130, 97–100.
- [20] Davis W., Ronai Z., Tew K.D. (2001), *Cellular thiols and reactive oxygen species in drug – induced apoptosis*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296, 1–6.
- [21] Robak J. (1997), *Chemioterapia nowotworów a antyoksydanty*. *Farmacja Pol.*, 53, 298–301.
- [22] Deneke S.M. (2000), *Thiol-based antioxidants*. *Cur. Top. Cell Regul.*, 36151–36180.
- [23] Sen C.K. (2000), *Cellular thiols and redox-regulated signal transduction*. *Curr. Top. Cell Regul.*, 36, 1–30.
- [24] Lynch S.M., Campione A.L., Moore M.K. (2000), *Plasma thiols inhibit hemin-dependent oxidation of human low-density lipoprotein*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1485, 11–22.
- [25] Klatt P., Lamas S. (2000), *Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress*. *Eur. J. Biochem.*, 201, 4928–4944.
- [26] Lou M.F. (2000), *Thiol regulation in the lens*. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 16, 137–148.
- [27] Wernerman J., Hamorquist F. (1999), *Modulation of endogenous glutathione availability*. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Care*, 2, 487–492.
- [28] Griffith O.W. (1999), *Biologic and Pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 922–935.
- [29] Włodek L., Rommelspacher H. (1997), *2-methyl-thiazolidine-2,4-dicarboxylic acid protects against paracetamol induced toxicity in human liver derived HepG2 cells*. *Acta Biochim. Polonica*, 44, 759–766.
- [30] Dröge W. (1993), *Cysteine and glutathione deficiency in AIDS patients: A rationale for the treatment with N-acetylcysteine*. *Pharmacology*, 46, 61.
- [31] Wardman P. (1995), *Reaction of thiyl radicals*. W: *Biothiols in Health and Disease*. Eds. Packer L., Cadenas E., 1–21.
- [32] Bartosz G. (1995), *Niebezpieczne jony metali*. W: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 86–93.
- [33] Saez G., Thornalley P.J., Hill H.A.O., Rems R., Bannister J.K. (1982), *The production of free radicals during the antioxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 719, 24–31.
- [34] Quijano C., Alvarez B., Gatti R.M., Augusto O., Radi R. (1997), *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups*. *Biochem. J.*, 322, 167–173.
- [35] Claiborne A., Yen J.J., Mallett T., Luba J., Crane E.J., Charrier V., Parsonage D. (1999), *Protein sulfenic acid: diverse role for unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation*. *Biochemistry*, 38, 15407–15416.
- [36] von Sonntag C. (1990), *Free radical reactions involving thiols and disulphides*. W: *Sulfur-centered reactive intermediates in Chemistry and Biology*. Eds. Chatgililoglu C., Asmus K.D., Plenum. Press, New York, 359–366.
- [37] Schöneich C. (1995), *Thiyl radicals, perthiyl radicals and oxidative reaction*. W: *Biothiols in Health and Disease*. Eds. Parker L., Cadenas E., 21–47.
- [38] Winterbourn C.C. (1993), *Superoxide as an intracellular radical sink*. *Free Rad. Biol. Med.*, 14, 85–90.
- [39] Winterbourn C.C. (1995), *Concerted antioxidant activity of glutathione and superoxide dismutase*. W: *Biothiols in Health and Disease*. Eds. Parker L., Cadenas E., Marcel Dekker, New York, 117–134.
- [40] Maiorino M., Roveri A., Gregolin C., Ursini F. (1995), *Phospholipid hydroperoxide, glutathione peroxide: More than an antioxidant enzyme?* W: *Biothiols in Health and Disease*. Eds. Parker L., Cadenas E., 265–288.

- [41] Dunster C., Willson R.L. (1990), *Thiyl radicals: electron transfer, addition or hydrogen abstraction reactions in chemistry and biology and the catalytic role of sulphur compounds*. W: *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*. Eds. Chatgililoglu C., Asmus K.D., Plenum Press, New York, 377–387.
- [42] Schwinn J., Sprinz H., Drossler K., Leister S., Brede O. (1998), *Thiyl radical-induced cis trans isomerization of methyl linoleate in methanol and linoleic acid residues in liposomes*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 74, 359–365.
- [43] Sprinz H., Schwinn J., Naumov S., Brede O. (2000), *Mechanism of thiol radical-catalyzed isomerization of unsaturated fatty acid residues in homogenous solution and in liposomes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1483, 91–100.
- [44] Zhang X., Zhang N., Schumann H.P., von Sonntag C. (1994), *Pulse radiolysis of 2-mercaptoethanol in oxygenated aqueous solution. Generation and radiolysis of 2-mercaptoethanol in oxygenated aqueous solution. Generation and reactions of the thiylperoxyl radical*. *J. Phys. Chem.*, 98, 6541–6547.
- [45] Wardman P. (1989), *Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution*. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 18, 1637–1755.
- [46] Grierson L., Hildebrandt K., Bothe E. (1992), *Intramolecular transformation reaction of the glutathione thiyl radical into non-sulphur-centered radical: a pulse radiolysis and EPR study*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 265–277.
- [47] Schöneich C., Bonifacic M., Dillinger V., Asmus K.D. (1990), *Hydrogen abstraction by thiyl radicals from activated C–H bonds of alcohols, ethers and polyunsaturated fatty acids*. W: *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*. Eds. Chatgililoglu C., Asmus K.D., Plenum Press, New York, 367–376.
- [48] De Gray J.A., Mason R.P. (1995), *Biothiyls: Free radical chemistry and biological significance W: Biothiols and Health and Disease*. Eds. Parker L., Cadenas E., New York, 65–81.
- [49] Munday R. (1995), *In vivo toxicity of thiols: relationship to rate of one-electron oxidation by oxyhemoglobin*. *Methods Enzymol.*, 251, 117–121.
- [50] Munday R., Manns E. (1994), *Comparative toxicity of prop(en)yl disulfides derived from alliaceae: Possible involvement of 1-propenyl disulfides in onion-induced hemolytic anemia*. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 959.
- [51] Munday R. (1994), *Bioactivation of thiols by one electron oxidation*. *Adv. Pharmacol.*, 27, 239–243.